木瓜基因組DNA快速萃取技術之開發與轉基因木瓜檢測技術之建立

Rapid DNA Extraction Method and Transgenic Papaya Detection.

李文立[1] 王德男[2]

Wen-Li Lee[1], Der- Nan Wang[2]

[1]助理研究員，鳳山熱帶園藝試驗分所，農業試驗所，農業委員會，鳳山，高雄，台灣；通訊作者，電子郵件：leewenli@fthes-tari.gov.tw

[2]研究員兼熱帶果樹系主任，鳳山熱帶園藝試驗分所，農業試驗所，農業委員會，鳳山，高雄，台灣。

[1] Assistant Researcher, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan

[2.] Researcher and head of department of tropical fruit, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Fengshan, Kaohsiung, Taiwan.

摘　要

自1975年起，台灣木瓜因遭受病毒病的危害而使木瓜產業衰退，雖然採用網室栽培可以防杜病毒病危害，但也會使栽培成本增加，成為栽培上的一項限制。近年來，生物技術的快速發展及轉基因作物的商業化，利用基因工程育成之抗病毒病轉基因木瓜分別在夏威夷、台灣及泰國等地被開發。然而生物安全性議題備受重視，世界先進國家均訂定轉基因作物之生物安全評估與管理制度。因此檢測技術的開發在世界各國均受到重視，又因為國際貿易上，農產品的輸出入為重要一環。快速而正確的檢測方法將會是一項重要關鍵。目前在轉基因作物檢測上仍以PCR法為最常用之方式，然而檢測前的DNA萃取工作往往耗時甚久（一般約2-8小時），成為檢測上主要的成本支出與限制，本研究利用不同比例之界面活性劑及緩衝液作為萃取液，可以大幅減少基因組DNA萃取時間，增進工作效率，此一快速萃

取方式也同時可以用在不同種類的果樹及蔬菜作物上，是一種方便且廣效的創新方法。另外，依照目前的檢測流程在檢測工作上，必須同時分別進行外源基因（轉殖入的基因）檢測以判定是否為轉基因木瓜及papain基因之擴增，以確認實驗是否有誤差。分別檢測的方式不僅，在人力、物力上需耗費許多的檢測成本，本研究中也發展多重PCR檢測方式，在同一試管中進行多引子對同時偵測外源基因及papain基因，不僅可以去除偽陰性也同時可節省檢測時間與經費。

關鍵字：木瓜，DNA萃取，快速，轉基因，檢測，聚合酵素鍊鎖反應。
Keywords: papaya, DNA extraction, rapid, transgenic, detection, PCR.

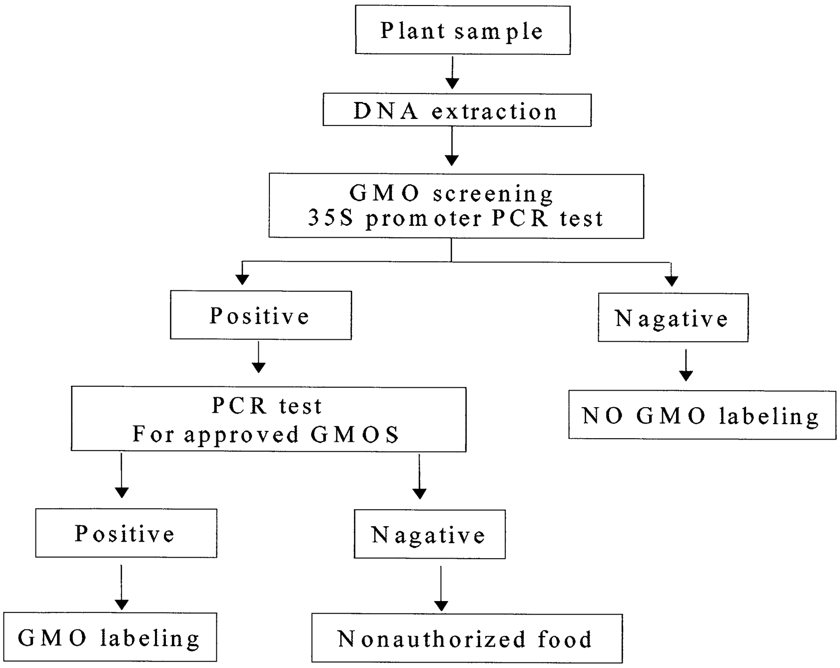
前　　言

自從 1975 年以來，台灣的木瓜產業嚴重受到輪點病毒病的危害，既使在栽培上使用網室栽培方式以克服蚜蟲的媒介傳播仍不免造成田間工作的成本與不便。近年來因為分子生物學的發展，生物技術的應用，轉基因作物(Genetically Modified Crop, GMC)的開發與商業化過程的加速，全球轉基因作物栽培面積不斷的增加，根據 ISAAA 的統計資料顯示，至 2005 年全球所栽培的轉基因作物種類雖然仍是大豆、玉米、油菜及棉花等作物為大宗，但是其生產面積已經達到 240 百萬公頃，相當於二分之一中國大陸的國土面積或二十個英國國土面積，種植轉基因作物的國家也增加為 21 個國家。正因為轉基因作物在全球的種植快速增加，但是其爭議性不斷，生物安全性的議題受到全球各個先進國家的重視，為了避免基因轉殖作物對生態環境及人類健康產生負面的影響，世界各國均制訂 GM 生物安全評估與管理制度，希望能有效管理基因轉殖作物，其檢測，監測與管控等工作也一直為各國主管該業務部門的重視。實務上，轉基因作物的檢測可以採用 DNA、RNA 或蛋白質作為檢測對象，但是以檢測與基因表現及轉錄調節有關之啟動子(promoter)如 CaMV35S 啟動子或終止子(terminator)如 NOS 終止子，或則是直接檢測篩檢標誌與報導基因為叫常見之檢測方式，RNA 因為結構上比較不穩定因此

較少成為大量篩檢之標的，僅在轉基因作物研究或基因表現分析時作為偵測之對象(沈等人，2006)，因此在國際上，主要的檢測方法仍是利用「聚合酵素鏈鎖反應法」(PCR)進行 DNA 定性篩檢，或是由「即時聚合酵素鏈鎖反應法」(Real-time PCR)進行定量篩檢，判定檢體樣品中含有 GMO 的比例。若檢測外源基因所產生之蛋白質時可利用抗體抗原反應機制藉由酵素連結免疫球蛋白法(ELISA)進行檢測，而在這些檢測方法中，以 PCR 的方式進行為多數國家採行，檢測流程如圖一。

進行 PCR 檢測時首先需進行 DNA 的萃取工作，以分離標作物的 DNA 作為 PCR 反應的模版，一般在進行 DNA 萃取時必須先解離細胞組織並讓 DNA 溶於萃取液中，然後以酵素或化學方法移除溶液中的蛋白質、RNA 及其他巨分子以避免在 PCR 反應之干擾。植物因細胞壁及含有許多二次代謝物質，其 DNA 萃取較困難，因此一般採行四個步驟：解離或破碎細胞、沈降、移除雜質、清洗 DNA 及重新溶解 DNA。依所使用的方法不同，其萃取過程約需時 2-8 小時或更高，在轉基因作物檢測上是一項耗時費財的工作項目(Clancy, 1996; Lin, 2001; Horne, 2004)，也往往限制了檢測的速度，若能建立快速萃取基因組 DNA 的技術將可以大幅減少轉基因作物檢測所需之時間與費用。本研究中試圖打破以往的 DNA 萃取方式，減少 DNA 萃取所需之時間並建立各種植物通用之快速 DNA 萃取方法以作為大量篩檢轉基因作物及快速檢測之用途。

除此之外，本文中也一併探討在 PCR 的檢測方法之下，不同引子所擴增之不同長度之 DNA 片段對於轉基因木瓜檢測知影響，探討多重 PCR 應用於轉基因木瓜之效果。



圖一：利用 PCR 進行 GM 作物檢測流程圖 (Adapted from Huebner et al, 1999)

材料與方法

1、植物材料：

本研究中所使用之新鮮植物材料（表一）均收集自鳳山熱帶園藝試驗分所，其栽培場所各異，包含溫室、網室、生長箱與田地並按一般方式進行栽培管理。

2、DNA 的萃取：

a. 植物材料之分離以打孔機取得葉圓片。

b. 利用不同萃取溶液（表二）及溫度條件進行上述植物材料之萃取。

c. 對照用傳統 DNA 的萃取採 Dellaporta 等（1983）所發表方法稍加修改，其大要如下：取植株嫩葉 100mg，加液態氮於研缽中磨碎，以 2 ml 萃取液(10mM Tris-HCl pH8.5, 10mM NaCl ，80mM Na_2EDTA, 10mM, 2-mercaptotethanol 0.1%(v/v), sodium sarkosyl 2% (w/v)) 破壞細胞，釋出基因組 DNA，65℃ 水浴以抑制酵素活性，並促使 DNA 溶入萃取液中，以 12000 rpm 離心十分鐘，上清液到入新離心管中並加入

等體積（ 10 ml ）酚 / 氯仿（ phenol / chloroform ）混合液去除蛋白質，離心後取上清液加入 0.6 倍體積的異丙醇（ isopropane ），在室溫下沈澱 DNA 20 分鐘，離心後去除上清液，以 70 % 酒精清洗兩次，風乾後加入適量的 1X TE 溶液（ 10 mM Tris-HCl, pH8.3 , 1 mM Na_2EDTA ）使 DNA 完全溶解後於 -20℃ 儲存備用。

3、DNA 之定量：

本實驗中所有 DNA 之定量以 Qubit 螢光定量儀（Invitrogen Co.）螢光定量方式進行，參照用之標準溶液及螢光物質亦購自該公司。

4、PCR 條件：

聚合酵素連鎖反應溶液為 1 X PCR 緩衝液（ 10 mM Tris-HCl pH 8.3 at 25℃, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 %（w / v）Triton X-100 ），dATP、dCTP、dGTP及 dTTP 各 200 μM。引子（ primer ）濃度為 1 mM，百合基因組 DNA 50 ng，1.2 U DNA polymerase（ *Thermus brockianus*, DynaZyme™II ），總反應體積為 25 μl，所有溶液混合後，覆蓋上 50 μl 礦物油（ Sigma mineral oil M3516 ）以避免水汽蒸發，以ABI2400(ABI, thermal cycler ）進行加熱與降溫反應。聚合酵素連鎖反應程式設定為 95℃，90 sec 使基因組 DNA 變性，95℃，30 sec.、55℃，30 sec.、72℃，60 sec.，總共進行 40 次循環，最後以 72℃，600 sec. 使反應完全。反應結束後加入 2.5 μl 10 X sample loading dye（1.0 mM EDTA-Na_2, 0.4 % bromophenol blue（w / v）, 0.4 % xylene cyand（w / v）, 50 % glycerol ）混合後進行電泳分析，未能及時進行電泳分析之樣品則冰存於-20℃留待後用。

5、電泳分析：

PCR 產物以 1X TAE 溶液（44.5mM Tris, Acetic acid 2ml, 1mM EDTA-Na_2, pH8.3），以 1.5 % Agarose gel（Boehringer Mannheim Crop. Cat.No.100 439 ），電流強度為 2.7 V / cm，（ Pharmacia Electrophoresis Power supply EPS 500/400 ）於室溫下電泳 30 分鐘。電泳結束後以 0.05 mg /

ml 溴化乙錠(Ethidium Bromide) 染色 30 分鐘，再用蒸餾水退染 15 分鐘，然後在 260 mm 波長紫外光下觀察(Transilluminator UVP inc.) DNA 條帶型，並照相記錄之。

6、資料分析：

利用 IS-1000 數位化影像分析系統（Clontech Co.）進行電泳片段之相對螢光量分析，並以 100bp ladder 之 3kb 片段為參照定量標準，所到之數據以 Costat 軟體進行分析並以 Sigma plot 軟體進行分析及繪製圖表。

表一、 本實驗中參試之植物種類及其學名

中　名	學　名
青梗白菜	*Brassica chinensis* L. CV. hing-Geeng
小白菜	*Brassica rapa chinensis*
萵苣	*Lactuca sativa* Linn
文心蘭	*Oncidium* spp.
空心菜	*Ipomoea aquatica* F.
煙草	*Nicotiana tabacum* L
油菜	*Brassia campestris* var.napus
百香果	*Passiflora edulis*
木瓜	*Carica papaya* Linn.

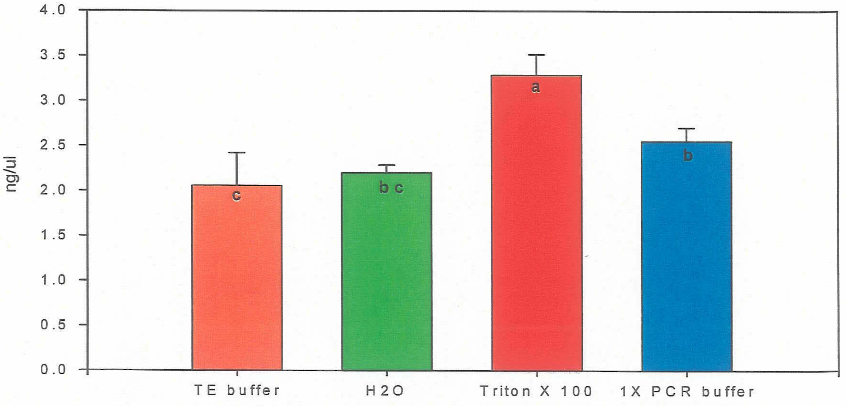
表二、本研究中使用之萃取溶液成分表

代號	普通名	組成份
A	1X TE buffer	1M Tris, 0.5M EDTA
B	Water	100% H_2O
C	界面活性劑	2% Triton X 100
D	1X PCR buffer	50mM KCl, 10mM Tris 1.5mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X 100

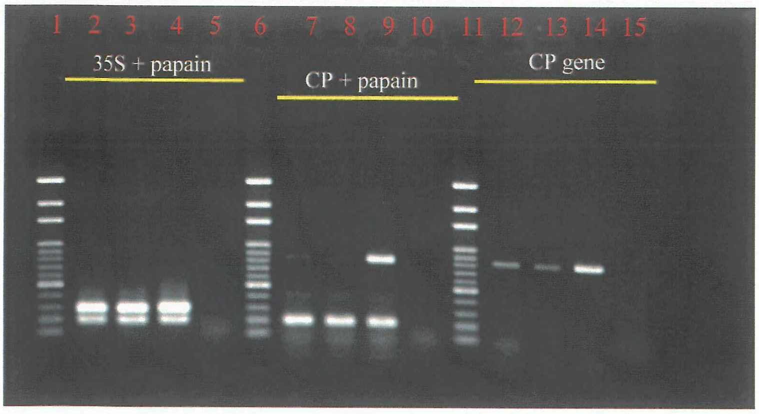
結果與討論

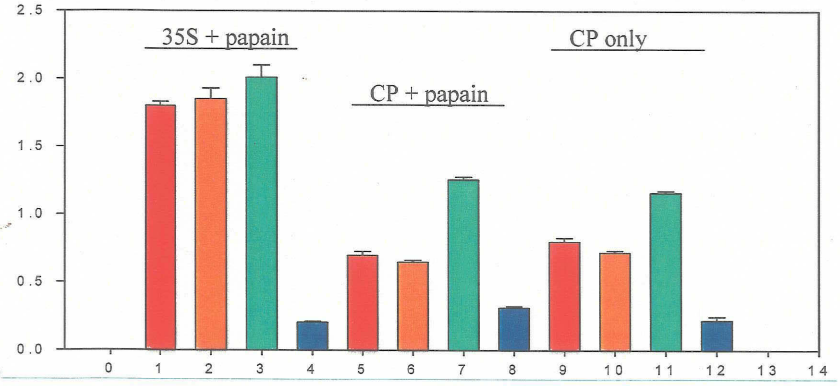
1. 不同萃取液組成對 DNA 萃取之效果：

在本研究的構想中希望突破 DNA 萃取之限制，採取簡單、易進行及可以進行 PCR 檢測之 DNA 萃取方式，因此在萃取步驟之設計上以打孔機剪取葉圓片作為植物材料定量之方式，平均一個葉圓片重約 0.3mg。為簡化植物組織破碎所耗費的時間，故不採用研磨方式，期能減少 DNA 萃取時間。本研究中以 PCR 為檢測方式，因此在萃取液的設計上以 PCR buffer 中已經使用且不影響 PCR 反應之成分作為萃取液，各代號之萃取液成分如表二。在參試的四種萃取液中均能萃取出 DNA，平均可以萃取之 DNA 量 2.5 ng/ul，其中以 C 組的萃取效率最佳，可以達 3.28 ng/ul，在 5%顯著水準下與其他各組比較，具有顯著之差異（圖二)。將這些不同萃取液所得到之 DNA 進行 PCR 反應並以 35S 及 papain 基因做為檢測的標準，仍以 C 組的 Trixton x100 的效果最好，該處理之 PCR 反應後目標條帶的擴增量亦較叫其他組高。此外，若比較不同偵測的基因片段，PCR 擴增片段較小之 35S 基因片段較常片段的 CP 基因容易檢出，不論單獨或以多重 PCR 方式進行 CP 片段之檢測時其基因生成量不若 35S，此結果也可能是 35S 在外源基因構築時有 2 個 copy 數，在基因轉殖木瓜中相對較容易被擴增之緣故。



圖二、不同萃取液對轉基因木瓜萃取效率。
*在 5%顯著水準之下不同字母代表具有顯著之差異。

A 

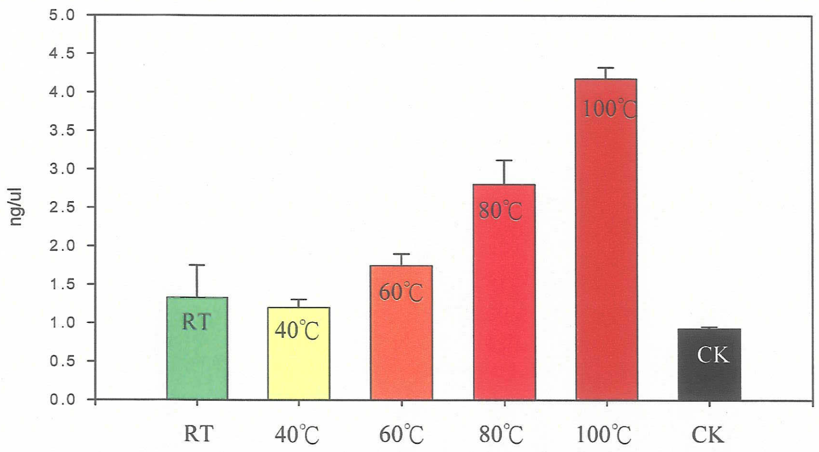
B 

圖三、不同萃取液組成對 DNA 萃取之影響

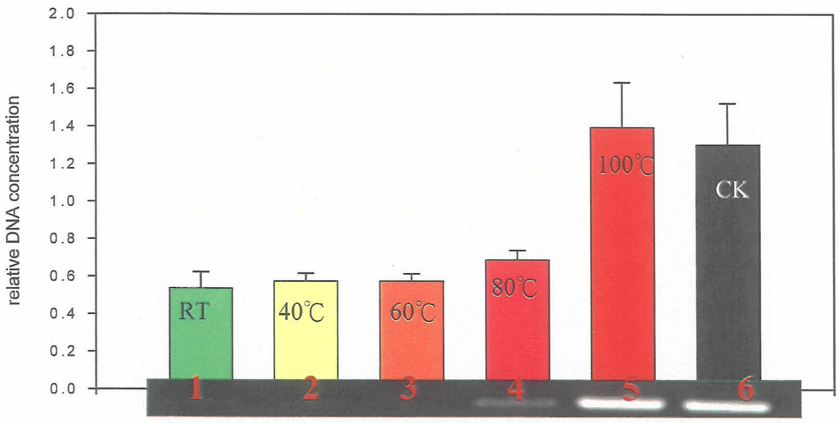
2. 不同萃取溫度對 DNA 萃取之效果：

在 DNA 萃取步驟中，增加萃取液溫度處理具有增加 DNA 溶解於萃取液中及使細胞中蛋白質變性，破壞其功能避免 DNA 遭降解之作用，減少 PCR 反應時的干擾。在本實驗中進行五種不同溫度之處理，隨著溫度的增加，所萃取之 DNA 含量也相對增加，以室溫與 40℃處理組 DNA 萃取濃度為 1.3 ng/ul，1.2 ng/ul，60℃ 與 80 ℃處理組為 1.7 及 2.8 ng/ul 至，100 ℃處理組為 4.1 ng/ul，溫度越高則 DNA 萃取量越多(圖四)，若以這些快速萃取之 DNA 進行 papain 基因片段之 PCR 檢測，在相同條件下擴增產物量相差較遠，而 80 ℃以下較低的萃取溫度其 DNA 濃度為 1.8ng/ul 以下，與傳統萃取方式（1ng/ul）相比較仍較高，而 PCR 生成物較少，顯然在 80℃以下溫度處理時所萃取之 DNA 中含有干擾 PCR 生成之物質存在，而 80 ℃與沸水處理組其 DNA 萃取之濃度分別為 2.80 ng/ul 及 4.17 ng/ul，除了 DNA 濃度較高以外，顯然干擾物質也較少。以實際操作面而言，利用 100℃水浴作為操作溫度具有免利用儀器控制水溫之優點，只需進行適當的加熱即可，利於實驗

之進行。這些PCR生成片段與100 bp DNA ladder 之 3kb 片段相比較，沸水處理組，PCR反應後DNA生成量為其1.25倍，其總DNA生成量甚至比傳統的DNA萃取方式的1.3倍為佳。與60 ℃以下溫度處理組的0.5倍相比較，DNA生成量高約2倍（圖五），此DNA生成量有利於後續的電泳檢測。



圖四、不同溫度對 Triton X100 DNA 萃取效率之比較。

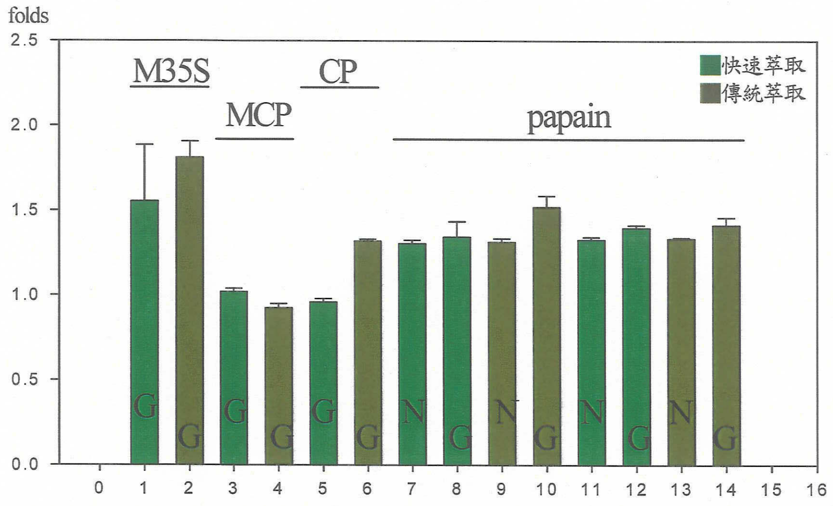


圖五、不同萃取溫度對 PCR 擴增 papain 基因片段之影響。

3. 檢測片段對不同萃取方式 DNA 之影響:

在轉基因木瓜檢測中，常使用35S啟動仔子區域及轉入之外源基因，CP基因區域作為檢測之標的，此兩基因之PCR片段長度並不相同，35S片段之擴增長度為213 bp 而 CP 基因之擴增長度為 817 bp。本研究中以此兩個基因進行比對，探討不同擴增片段長度對上述之快速 DNA 萃取方式之影響，其結果如圖六。結果顯示當目標基因片段較短時，PCR的產物量會增加，當目標基因片段較長時，PCR產物量會

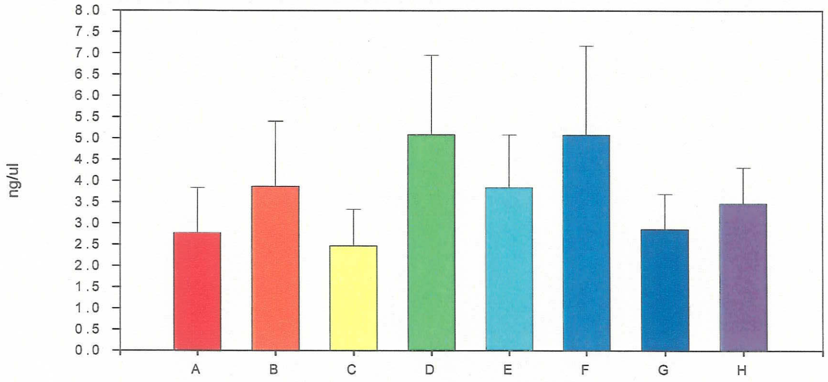
減少且當進行多重 PCR 與單獨 PCR 之相同基因片段產量並無差異性，顯示在多重 PCR 實驗中兩個基因之合成並無相互干擾與競爭而使產量降低，表明了在本研究中的多重 PCR 實驗為合適且適當。而本研究中發展之快速萃取方法與傳統萃取方法比較其相同目標基因之 PCR 產量時不論是否為轉基因木瓜其差異性不明顯，顯示本快速萃取方法確實為可靠，不干擾實驗結果之良好 DNA 萃取方法。



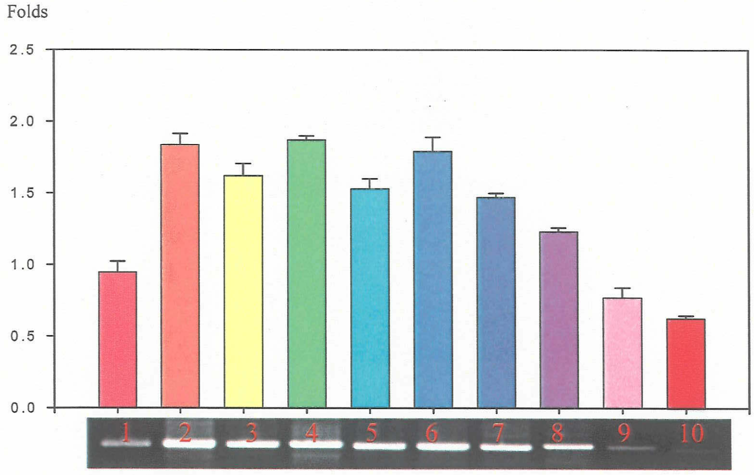
圖六、不同 DNA 萃取方法與不同基因片段 PCR 擴增產量。

4. 作物種類對快速萃取方式之影響

本研究之 DNA 快速萃取方法對於不同種類之植物材料同樣具有良好的萃取效果，這些參試材料可以萃取得到 2.5ng/ul 至 5ng/ul 濃度之 DNA（圖七 A），若以這些快速萃取之 DNA 進行 PCR 反應，以 ITS 片段作為檢測之標的，則所有的植物材料均可以擴增出該片段（圖七 B），顯示所有參試材料未來均可利用此一快速萃取方法作為轉基因作物篩檢或其他以 PCR 作為實驗方法之研究，可應用範圍甚廣。



圖七 A、不同種類植物材料以本研究之快速萃取方式進行 DNA 萃取之濃度
樣品由右而左依序為：A. 百香果，B. 煙草，C. 萵苣，D. 空心菜，E. 文心蘭，F. 油菜，G. 小白菜及 H. 木瓜。

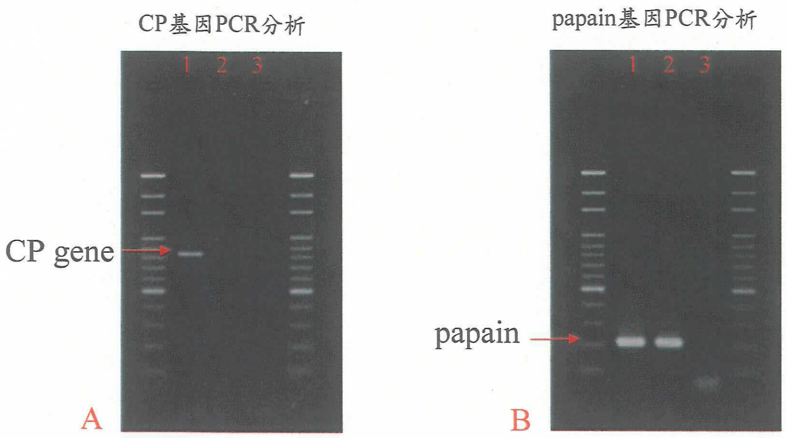


圖七 B、不同種類植物材料以本研究之快速萃取方式萃取 DNA 後以 ITS 為標的進行 PCR 反應之結果。
樣品由右而左依序為：A. 百香果，B. 煙草，C. 萵苣，D. 空心菜，E. 文心蘭，F. 油菜，G. 小白菜及 H. 木瓜。

5. 轉基因木瓜檢測技術之建立

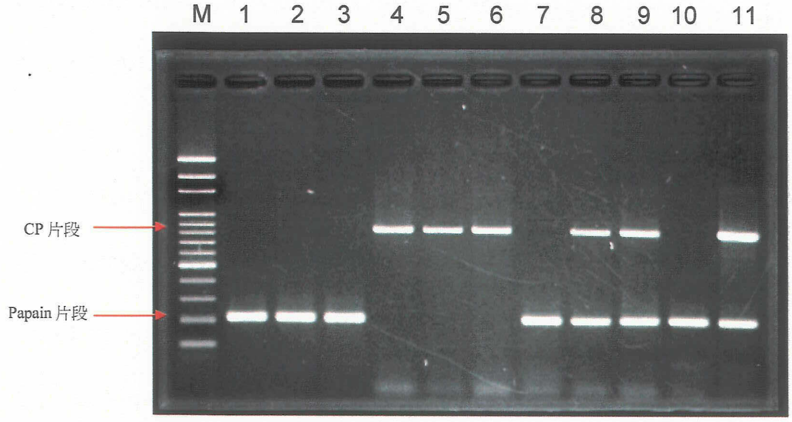
轉基因木瓜品系所含有之外源基因為木瓜輪點病毒之鞘蛋白(PRSV, CP)，完整的轉基因木瓜外源基因包含有前端的 35S 啟動子（promoter），後端具有 nos 終止子(terminator)並具有 npt II 基因以抵抗 neomycin 類抗生素，因此這些外源基因均可作為檢測的標的。以往在進行轉基因木瓜的檢測時往往採用單引子對的 PCR，然而進行單引子對的檢測時因為需確認檢體 DNA 的有效性，需另外進行對照實驗，此對照實驗常採用 papain 基因作為對照，若外源基因未被檢測出來而 papain 基因片段可以被檢出則表示該 DNA 檢體無異常，實驗結果可以信賴，若

papain 基因無法檢出則顯示實驗過程有瑕疵（圖八），應進行重複以確認實驗結果。這樣的檢測流程往往耗費時間與人力，若能採用多重聚合酵素鏈鎖反應（multiplex PCR），同時進行 papain 內對照與外源基因之檢測則可以節省時間與經費又可以確保檢驗之正確性（圖九），是一舉數得的美事。



圖八、轉基因木瓜檢測時以外源基因作為檢測之標的（A），並另外進行對照（B）以確認檢測結果無誤。

A. 以 CP-MO926/CP-M1008(840bp)引子對進行 PCR 分析，進行轉基因木瓜檢測。Lane 1 為 GM 木瓜；Lane 2 為一般木瓜；Lane 3 為 Negative control, H_2O。
B. 以 papain-F/papain-R(211bp) 引子對進行 PCR 分析，進行轉基因木瓜檢測之檢體確認。Lane 1 為轉基因木瓜；lane 2 為一般木瓜；lane 3 為 Negative control (H_2O)。



圖九、以多重 PCR 進行轉基因木瓜檢測，可以快速、方便且正確的提供檢測結果。Lane 1 為基改木瓜；Lane 2 為基改木瓜；Lane 3 為基改木瓜；Lane 4 為基改木瓜； Lane 5 為基改木瓜；Lane 6 為基改木瓜；Lane 7 為非基改木瓜；Lane 8 為基改木瓜；Lane 9 為基改木瓜；Lane 10 為傳統木瓜； Lane 11 為傳統萃取法之基改木瓜。Lane1～3 Primer (Papain F+R). Lane 4~6 Primer (CP F+R). Lane7~11 primer(papain F+R + CP F+R)。

結　　語

生物技術快速的發展使許多帶有新基因的作物陸陸續續被創造，而由於人們對這些攜帶外源基因的作物存有疑慮，也造成現今轉基因作物檢測及生物安全之議題，在以往轉基因檢測時需花費許多時間進行檢體DNA的萃取，本文所提出之DNA 快速萃取方式將會是一種具有高效率，經濟性及可同時進行大量篩檢之方法，不僅是在轉基因作物之檢測上具有相當良好之應用性，在基因轉殖初期篩檢之過程也具有相當良好之篩檢功能，可以節省大量之經費與時間。此外，在以往進行PCR檢測轉基因作物時，對照與檢測標的基因分開進行之方式不僅使人力與經費增加，也具有檢測不確定之風險，利用多重PCR的檢測方式不僅可以解省經費減少檢測時間也去除檢測之不確定性，實為一值得採行之方法。

參考文獻

1. Hsu-Yang Lin, Hsiu-An Wei, Fu-Pang Lin, and Daniel Yang-Chih Shih (2006) Study of PCR Detection Methods for Genetically Modified Soybeans with Reference Molecules. Food and Drug Analysis 14:194-202 .
2. Erinc. Horne, Siva P. Kumpatla, Koni A. Patterson, Manju Gupta and Steven A. Thompson (2004) Improved High-Throughput Sunflower and Cotton Genomic DNA Extraction and PCR Fidelity. Plant Molecular Biology Reporter 22:83a-83i .
3. Lenka Drábková, Jan Kirschner and Cestmir Vlcek (2002) Comparison of Seven DNA Extraction and Amplification Protocols in Historical Herbarium Specimens of Juncaceae. Plant Molecular Biology Reporter 20: 161 – 175.
4. Rong-Cheng Lin, Zai-Song Ding, Liang-Bi Li and Ting-Yun Kuang . (2001) A Rapid and Efficient DNA Minipreparation Suitable for Screening Transgenic Plants . Plant Molecular Biology Reporter 19: 379a – 379e.

5. Eve Dilworth and Juerg E. Frey (2000) A Rapid Method for High Throughput DNA Extraction from Plant Material for PCR Amplification . Plant Molecular Biology Reporter 18: 61－64 .
6. J. lancy, V. . itkov, F. Han and S. E. Ullrich (1996) Barley tissue as direct template for PCR: a practical breeding tool. Molecular Breeding 2:181-183.
7. J. J. Steiner, C. J. Polemba, R. G. Fjellstrom, and L. F. Elliott (1995) A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses . Nucleic Acids Research 23: 2569 - 2570 .
8. http://plantsciences.utk.edu/pdf/rapiddnaextractionfromplants.pdf
9. 羅致逑（2006）基改植物之環境安全風險評估。科技發展政策報導。SR9505.
10. 沈翰祖、陳駿季、邱展台、羅致逑、李文立、張隆仁、林新強、楊藹華、王雲平、陳富永、王啟正、方　繼、郭寶錚、包慧俊（2006）基因轉殖作物檢測監測體系之建立. 農業生技產業季刊. Vol.5, P.35-40.

Abstract

Since 1975, the industry of papaya was series damage by papaya ring sport virus in Taiwan. Although the net house culture techniques are a good practice to protect papaya avoid virus infection, but the production cost was higher than tradition method and became a limited factor of papaya industry in Taiwan. In these years, biotechnology is growth faster and transgenic crops were commercialized. The transgenic papayas are released to Hawaii, Taiwan and Thailand, respectively. In the other hand, the biosafety issues are more and more importance in global. Most of the developed country established evaluation and management system for GMOs, How to detect GMOs rapidly and economy is a key point in biosafety issues. In this moment, polymer chain reaction (PCR) is the major technique of GMOs

detection but the DNA extraction spend too much time (2-8 hr.) is a limited factor of this technique. In this study, using different solutions for DNA extraction and by pass grinding make DNA extraction easy and quickly. This easy quickly DNA extraction method is also suitable for other plants is a convenient, wide use and high throughput new method.